

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM

München

(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von 6-Mercaptopurin
auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Joachim Klimas
aus Berlin

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K. Hölldack
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM
München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von 6-Mercaptopurin
auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Joachim Klimas
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. Walther Pribilla



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21. 5. 1971

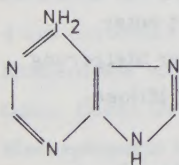
INHALT

	Seite
I. Einleitung und Fragestellung	4
II. Methode	9
III. Ergebnisse	15
IV. Diskussion	23
V. Zusammenfassung	27
VI. Tabellen und Abbildungen	28
VII. Literatur	46

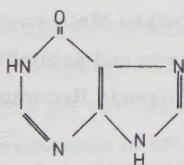
I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Auf der Suche nach einer geeigneten Therapie der Leukämie bekamen die zytostatisch wirkenden Medikamente immer mehr Bedeutung. Zytostatika sind chemische Substanzen unterschiedlicher Struktur, die auf verschiedene Weise den Stoffwechsel von Zellen stören können (33, 37). Sie sind deshalb besonders geeignet, die mit einer weitverbreiteten Proliferation der Zellen einhergehenden Leukämien günstig zu beeinflussen.

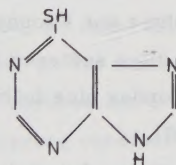
Neben dem 1947 von SEEGERs und Mitarbeitern dargestellten Aminopterin, einem Folsäureantagonisten, jedoch wegen der allgemeinen Toxizität klinisch nicht so bewährt (4, 5), wurde 6-Mercaptopurin, ein Purinantagonist, immer häufiger angewandt. Es wurde 1951 bis 1953 von ELION und Mitarbeitern in den Wellcome-Forschungslaboratorien in Tuckahoe bei New York entwickelt (19, 20) und von BURCHENAL und seinen Mitarbeitern 1954 im Sloan-Kettering-Institut erstmals klinisch erprobt (10, 11, 12, 13, 14). Das Präparat, mit dem Handelsnamen Puri-nethol [®], hat sich bei der Behandlung aller Formen der akuten Leukämie bewährt, auch bei einigen Fällen von chronischer myeloischer Leukämie (7, 8, 25). 6-Mercaptopurin ist den Purinen Adenin und Hypoxanthin chemisch verwandt.



Adenin



Hypoxanthin



6-Mercaptopurin

Mikrobiologische Untersuchungen haben ergeben, daß Mercaptopurin ein Antagonist von Adenin und Hypoxanthin, jedoch nicht von Folsäure ist. 6-Mercaptopurin wirkt als Antimetabolit und stört den Metabolismus

der Dexoxyribonukleinsäure, durch Einbau leicht abgewandelter chemischer Gruppen in das Molekül, die im normalen Stoffwechsel nicht vorkommen. Bei Versuchen mit radioaktivem Mercaptopurin wurde festgestellt, daß die Substanz von den Granulocyten aufgenommen wird und etwa zwei Wochen in ihnen verbleibt. Dies legt die Vermutung nahe, daß das Präparat seine Wirkung innerhalb der leukämischen Zelle entfaltet (21, 31, 33).

Im Unterschied zu den Folsäureantagonisten wird 6-Mercaptopurin in die Nukleoside bzw. Nukleotide inkorporiert, wobei die Folsäureantagonisten die DNS-Synthese der Folsäure stören (10, 38).

Bei den Antimetaboliten ist es immer noch ein wichtiges Problem, einen Stoff zu finden, der zwar das Wachstum maligner Zellen stört, dabei jedoch keine oder nur eine schwache zytostatische Wirkung auf die gesunden Zellen des Knochenmarkes ausübt (18). GERHARTZ weist darauf hin, daß man von einem Zytostatikum keine vollständige Vernichtung autonomer Proliferationen erwarten kann, ohne die gesunden Zellen zu schädigen (27).

Die zytostatische Wirkung von 6-Mercaptopurin sieht GERHARTZ in der Störung der Interphase der Zelle, also zur Zeit der Reproduktionen ihrer Chromosomen. Er findet, daß 6-Mercaptopurin zu einer Zunahme der Prophasen und frühen Metaphasen führt unter Minderung aller späteren Mitosephasen und schließt aus der Steigerung des Mitoseindex eine frühzeitig erfolgende Hemmung des Mitoseablaufes (27).

In einer weiteren Arbeit konnte GERHARTZ an Gewebekulturen vom Knochenmark akuter Leukosen nachweisen, daß 6-Mercaptopurin den prozentualen Gehalt an Myeloblastenmitosen erheblich steigert, während Promyelozyten- und Myelozytenmitosen relativ selten werden. 6-Mercaptopurin führt demnach durch Verzögerung des Ablaufs der Myeloblastenmitosen zu einer Reifungshemmung. Leider fehlt in dieser Arbeit eine Angabe über die verwandten Konzentrationen (27, 29).

Auf Grund seiner Untersuchungen glaubt GERHARTZ, daß die Folsäureantagonisten die Promyelozytenmitosen, die alkylierenden Substanzen die Myelozytenmitosen und die Purinantagonisten die Myeloblastenmitosen hemmen (27, 29).

In vielen Arbeiten wird die klinische Erprobung des 6-Mercaptopurin behandelt. BROSS zeigte in seiner statistischen Auswertung, daß Kinder im allgemeinen besser auf die Behandlung ansprechen als Erwachsene. Er erzielte bei Kindern 36% Remissionen, dagegen bei Erwachsenen nur 15% (9). OEHME gibt an, daß er mit der Dreimittelbehandlung (6-Mercaptopurin, Prednison und Bluttransfusionen) bei etwa 70% der Kinder Remissionen erreicht hatte. Er gibt bei einem Vergleich zwischen Folsäureantagonisten und 6-Mercaptopurin an, daß bei den Folsäureantagonisten die Depression des normalen Blutbildes stärker ist als bei 6-Mercaptopurin, meint, daß beiden Antimetaboliten Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe als Nebenwirkung gemeinsam ist. Nach langen Gaben können Fibrosen und Zirrhosen der Leber auftreten (35, 36). BURCHENAL gibt ähnliche Nebenwirkungen an, kann jedoch keine Schäden an der Leber und an der Niere beobachten.

BURCHENAL hat die Wirksamkeit von 6-Mercaptopurin an 140 Patienten mit akuter Leukämie, 18 mit chronisch-myeloischer und 4 mit chronisch-lymphatischer Leukämie erprobt. Er nahm die übliche Kinderdosis von 2,5/kg Körpergewicht täglich per os bei einmaliger Gabe. Diese Dosis wurde gut vertragen, jedoch verursachte 6-Mercaptopurin bei Erwachsenen in höherer Dosierung vereinzelt schwere Knochenmarkdepressionen (12, 13, 14).

ZUELZER führte über einen Zeitraum von 9 Jahren 175 Kindern, die an akuter Leukämie litten, eine Kombinationsbehandlung von Steroiden und 6-Mercaptopurin zu. 6-Mercaptopurin wurde zeitweilig abgesetzt und durch Methotrexat ersetzt. 50% der Patienten überlebten 17,2 Monate, 25% 27,5 Monate und bei 10% betrug die Überlebenszeit 45 Monate.

Der Autor meint, daß eine Kombinationsbehandlung von Anfang an der allgemeinen Behandlung mit Antimetaboliten klinisch überlegen sei (16, 40, 41).

Bei der Behandlung chronisch myeloischer Leukämien mit 6-Mercaptopurin haben FOUNTAIN und BURCHENAL bei einer einmaligen Gabe von 2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag bei den Patienten gute Ergebnisse. Besonders zufriedenstellend waren die Ergebnisse bei den Patienten, die im Frühstadium der chronisch myeloischen Leukämie behandelt wurden (25). FOUNTAIN gibt an, daß die optimale Dosis von 6-Mercaptopurin von 50 bis 150 mg pro Tag variiert. Die besten Ergebnisse beobachtete er bei einer über der Norm stehenden Leukozytenzahl, bei 20 000 bis 50 000/cmm. Die Patienten zeigten keine Symptome mehr und hatten gute Hämoglobinwerte (24). Die Leukozytenzahl wurde gesenkt und die unreifen myeloischen Zellen vermindert. Auch MOESCHLIN und PRIBILLA betonen, daß bei der zytostatischen Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie die Leukozytenzahl von 20 000 pro cmm möglichst nicht unterschritten werden soll. Die Autoren sind sich aber einig, daß 6-Mercaptopurin eine bessere Wirkung bei der Behandlung von akuten Leukämien zeigt (34, 37). Bei chronisch lymphatischer Leukämie, Lymphosarkom und Lymphogranulomatose war 6-Mercaptopurin ohne therapeutischen Wert.

DAVIDSON prüfte bei Leukämiepatienten, aber auch bei Gesunden, wieweit die Aktivität der Purinnukleotid-pyrophosphorylasen mit der Resistenz einiger Patienten auf 6-Mercaptopurin zusammenhing, und kommt zu dem Schluß, daß die 6-Mercaptopurinresistenz menschlicher Leukämien in der Mehrzahl der Fälle nicht durch einen Verlust an Fermentaktivität zu erklären ist (17).

Weiterhin wird 6-Mercaptopurin wegen seiner immunsuppressiven Wirkung angewandt. FINGER stellte einen deutlichen Unterschied in der immunsuppressiven Wirkung des 6-Mercaptopurins bei verschiedenen Tierarten fest (22, 23, 28, 39). Auch GERHARTZ weist auf die

klinische Bedeutung der Zytostatika zur Unterdrückung von Immunreaktionen hin. Er stützt sich auf Erfahrungen mit Patienten, die an einer chronischen fibrosierenden Hepatitis mit atrophischen Leberzirrhosen, hämolytischen Anämien oder rheumatischen Polyarthritiden leiden. Bei diesen Patienten wurde das in letzter Zeit sehr bedeutend gewordene Azathioprin (Imuran [®]) verabreicht. Azathioprin wird nach seiner Resorption in der Leber zu 6-Mercaptopurin aufgespalten. Die Verträglichkeit ist allgemein gut, allerdings ist ein Therapieerfolg frühestens nach drei Monaten, durchschnittlich nach sechs Monaten zu erhalten. Nun interessiert bei 6-Mercaptopurin die zytostatische Wirkung auf die Hämatopoese, besonders auf die Granulozytopoese. Es tritt die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt der Proliferation 6-Mercaptopurin wirkt; ob es den Ruhe kern schädigt oder eine Störung der Mitose hervorruft. Wenn letzteres der Fall wäre, gilt es zu erfahren, welcher Zelltyp beeinflusst wird und in welcher Phase der Mitose diese Zellen arretiert werden.

In dieser Arbeit soll nun die direkte Wirkung von 6-Mercaptopurin auf die Proliferation des menschlichen Knochenmarkes unter Ausschaltung der nervalen und humoralen Beeinflussung untersucht werden. Dazu werden Ausstriche von Koagulumkulturen drei Tage lang nach Pappenheim gefärbt, gezählt und aus der Differentialverteilung und den Mitoseindices die Reifung und Regeneration in vitro beurteilt.

II. METHODE

Nach der CARREL'schen Technik, modifiziert von BOLL, wurden Kulturen von menschlichem Knochenmark im hängenden Koagulum angefertigt (2, 3). Das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark wurde auf einen koagulierten Tropfen gesetzt, der zu 50% aus Nativplasma, zu 40% aus Hankscher Lösung und zu 10% aus Corhormon® bestand. Auf das Ganze wurde ein weiterer Tropfen Serum gegeben. Es wurden folgende Kulturen von den Patienten angesetzt:

1. Kontrollkulturen ohne 6-Mercaptopurinzusatz im Koagulum und überstehendem Serumtröpfchen,
2. Kulturen mit einem Zusatz von 0,05 mg% 6-Mercaptopurin im Koagulum und überstehendem Serumtröpfchen,
3. Kulturen mit einem Zusatz von 0,1 mg% 6-Mercaptopurin,
4. Kulturen mit einem Zusatz von 0,5 mg% 6-Mercaptopurin.

Diese Kulturen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sie wurden immer in mehrfacher Anfertigung angelegt, um Schwankungen auszugleichen, die durch das Ausstreichen entstehen können.

Nach 24, 48 und 72 Stunden Kulturzeit wurden von allen Kulturen Ausstriche angefertigt und nach PAPPENHEIM gefärbt. Unmittelbar nach der Sternalpunktion wurden ebenfalls Ausstriche angelegt.

Von zwei Patienten mit einer akuten und einer chronischen Leukämie wurde peripheres Blut zur Flüssigkeitskultur für 24 Stunden in einem Fall und für 24 und 48 Stunden in dem zweiten Fall verwendet. Das Medium enthielt eine Plasma-Zellsuspension und eine Mischung aus TC Eagle⁺, Corhormon® und Antibiotikaspuren.

Bei der meanderförmigen Zählung der Zellen der Erythro- und Granulopoese wurden die aufgelockerten Randgebiete der Präparate bevorzugt, um größtmögliche Genauigkeit bei der Differenzierung

der einzelnen Zellformen zu erreichen. Aus jedem Präparat wurden möglichst 2000 Zellen ausgezählt, abhängig von der Qualität des Ausstriches. Im ganzen wurden ungefähr 65 000 Zellen ausgezählt, wovon die Retikulumzellen, Plasmazellen, Megakaryozyten und Lymphozyten nicht ausgewertet wurden.

Nach der Differentialzählung wurden die relativen Zellzusammensetzungen der Zellklassen innerhalb der Granulopoese und der Erythropoese bestimmt, deren Abweichungen während der Kulturzeit von 24, 48 und 72 Stunden ermittelt und graphisch in Reifungskurven dargestellt. Ebenfalls wurde für jede Kultur der G/E-Index errechnet. Dieser gibt das Verhältnis zwischen den Zellen der Granulopoese und der Erythropoese an, somit bekommen wir Aufschluß über das Verhalten der Granulopoese zur Erythropoese. Anschließend wurden die Mitoseindices in den einzelnen Originalen und in den Kulturen mit und ohne 6-Mercaptopurinzusatz ermittelt und die prozentuale Mitosenverteilung in karyologischen Kurven dargestellt. Als Mitoseindex wurde die Anzahl der Mitosen im Verhältnis zu der Zahl der teilungsfähigen Zellen verstanden. Zu den teilungsfähigen Zellen gehören in der Granulopoese die Granuloblasten (Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Promonocyten) nach ROHR. In der Erythropoese gehören zu den teilungsfähigen Zellen sämtliche roten Zellklassen, ausgenommen die reifen Erythroblasten.

Die rote Reihe wurde differenziert in:

- Proerythroblasten (PE)
- basophile Erythroblasten (bE)
- polychromatische Erythroblasten (pE)
- oxyphile Erythroblasten (oE)
- reife Erythroblasten (rE)

und die weiße Reihe wurde in

- Myeloblasten (MB)
- Promyelocyten (PM)
- neutrophile Myelocyten (MC)

eosinophile Myelocyten (eMC)
basophile Myelocyten (bMC)
Promonocyten (PMo)
Metamyelocyten (MM)
stabkernige Granulocyten (StG)
segmentkernige Granulocyten (SG)
eosinophile segmentkernige Granulocyten (eSG)
basophile segmentkernige Granulocyten (bSG)
Monocyten (Mo)

Der Proerythroblast ist die jüngste Zelle der roten Reihe. Der große, runde Kern hat ein dichtes, feinkörniges Chromatinnetz und ist überall gleichmäßig von einem dunkel-basophilen Zytoplasmasaum umgeben, der häufig perinukleär eine Aufhellungszone zeigt.

Bei dem basophilen Erythroblasten verschiebt sich die Kern-Plasma-relation zu Gunsten des dunkel-basophilen Zytoplasmas, das nicht mehr so gleichmäßig wie beim Proerythroblasten den grobschollig strukturierten Kern umgibt. Auch besitzt der dichter strukturierte Kern keine Nukleoli mehr.

Der Kern des polychromatischen Erythroblasten zeigt eine grobschollige Struktur mit radspeichenartig angeordneten Chromatinverklumpungen. Das Zytoplasma beginnt Hämoglobin aufzunehmen und variiert daher je nach Reife von grauviolett bis grau-rosa.

Der oxyphile Erythroblast hat ein nur noch mit Hämoglobin beladenes Zytoplasma, das deshalb die Farbe der Erythrocyten hat. Der Kern ähnelt noch denen der polychromatischen Erythroblasten, unterscheidet sich von diesen nur durch eine fortgeschrittene Verklumpungserscheinung und Verkleinerung.

Der reife Erythroblast hat einen pyknotischen, dunkelvioletten, meist exzentrisch liegenden Kern.

Die Stammzelle der weißen Reihe ist der Myeloblast. Die Kern-Plasma-relation ist zu Gunsten des Kerns verschoben, nur ein schmaler, hellbasophiler Zytoplasmasaum umgibt den wegen seiner dichten und feinmaschigen Chromatinstruktur verwaschen wirkenden Kern. Granula sind noch nicht vorhanden, aber einige bläulich gefärbte Nukleoli sind oft deutlich zu erkennen.

Der Promyelocyt ist die größte Zelle der Granulopoese und fällt durch grobe, azurophile, dunkelrote Granula auf, die unregelmäßig über Kern und Plasma verteilt sind. Der Zytoplasmasaum ist im Vergleich zum Myeloblasten breiter und weniger basophil und ähnelt oft schon mehr dem des Myelocyten. Der Kern ist nicht mehr rund, sondern häufig oval oder leicht eingebuchtet. Nukleoli sind nur selten vorhanden. Bei dem neutrophilen Myelocyten sind die Granula feiner geworden und reagieren nicht mehr azurophil, sondern neutrophil. Die Zelle ist im ganzen wieder kleiner geworden, das Zytoplasma hat einen graublauen bis oxyphilen Farbton angenommen. Der oft nierenförmig eingebuchtete Kern hat ein noch dichteres Chromatingerüst als der Promyelocyt; Nukleoli sind nicht zu erkennen.

Der eosinophile Myelocyt ist charakterisiert durch plumpe, eosinophile Granula, die, ebenso wie beim basophilen Myelocyten die basophile Granula, Kern und Plasma weitgehend überdecken.

Der Promonocyt ist in der Größe dem Promyelocyten ähnlich, jedoch zeigt der Kern häufig einseitige Einbuchtungen. Das Kernchromatin erscheint locker. Das weite, rauchgraue Zytoplasma mit selten schwacher Azurgranulation ist charakteristisch.

Der Metamyelocyt oder jugendliche Granulocyt ist in Plasmafärbung und Granulation dem Myelocyten ähnlich, hat aber einen stärker gebuchteten Kern mit dichterem Chromatinstruktur.

Beim stabkernigen Granulocyten ist der Kern hufeisenförmig und wirkt in seiner Chromatinstruktur gröber und dunkler als der des Metamyelocyten. Das Plasma ist oxyphil, die Granula sind fein und

spezifisch gefärbt.

Der segmentkernige Granulocyt weist im Unterschied zum stabkernigen an verschiedenen Stellen des Kerns fadenförmige Einschnürungen auf, so daß meistens drei bis vier Segmente entstehen. Das Plasma ist oxyphil.

Beim eosinophilen bzw. basophilen segmentkernigen Granulocyten finden sich im allgemeinen nur zwei rundlich-ovale Segmente, die durch sehr kurze Fäden zusammenhängen und von eosinophilen bzw. basophilen Granula bedeckt sind.

Als größte Zelle des peripheren Blutes haben wir den Monocyten, der durch sein charakteristisch rauchgraues Zytoplasma mit einem großen, gelappten, polymorphen Kern auffällt. Nukleolen sind nicht vorhanden.

Neben der Differenzierung der einzelnen Zellformen wurde besonderer Wert auf die Abgrenzung der verschiedenen Mitosephasen gelegt. Der Ablauf der Mitosen wurde nach BOLL in sechs Phasen unterteilt:

1. Prophase

Nach der Auflösung der Kernmembranen ist die Kernsubstanz aufgelockert und die Nukleoli verschwinden. Die Chromosomen werden teilweise als Fäden sichtbar und sind in einem festen Spirem angeordnet.

2. Frühe Metaphase

Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt, es entsteht ein lockeres Spirem.

3. Späte Metaphase

Die Chromosomen verdoppeln sich und ordnen sich zur Äquatorialplatte bzw. zum Monaster an.

4. Anaphase

Die Chromosomen sind zu den Spindelpolen auseinandergewichen, es bildet sich ein Diaster.

5. Telophase

Das Zellplasma schnürt sich durch, die Chromosomen sind zu einem lockeren Dispirem geordnet.

6. Rekonstruktionsphase

Die beiden Tochterzellen sind bis auf eine dünne Plasmabrücke, oft aber auch völlig getrennt. In beiden Zellen liegen die Chromosomen noch im Spirem angeordnet, Kernmembran und Nukleoli sind noch nicht erkennbar.

Außerdem wurde nachgeprüft, ob die abweichende Zellverteilung unserer Differentialzählungen zufallsbedingt oder signifikant ist. Wir bedienten uns dabei des χ^2 -Testes nach HELMERT PEARSON, wobei für die weiße Reihe mit 10 differenzierten Zellformen die Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% bei $\chi^2 = 20$, in der roten Reihe mit 5 Zellformen bei $\chi^2 = 13$ lag (26).

Dabei sind:

a = Zellzahl in den Zusatzkulturen

b = Zellzahl in den Kontrollkulturen

$$m = \frac{a+b}{2}$$

Bei zu unterschiedlichen Differenzen in den Summen von a und b wurde der Faktor $\frac{\text{Summe a}}{\text{Summe a} + \text{Summe b}}$ bestimmt, der dann mit

der Summe der einzelnen Zellformen multipliziert wurde.

Dieser Faktor steht unter $m \cdot \Delta = a - m$.

III. ERGEBNISSE

Es werden die Ausstriche von vier Knochenmarkkulturen und von zwei Blutkulturen ausgewertet.

Die Einzelergebnisse wurden folgendermaßen eingeteilt:

Klinische Befunde und Labordaten,
Befundung des Sternalpunktats bzw. des Blutausstriches,
Reifungskurven der Erythropoese und der Granulopoese,
Signifikanzberechnungen der gefundenen Werte,
Mittelwerte der Mitoseindices,
Karyologische Kurven,
G/E-Indices.

Die erste Versuchsreihe (Tab. 1 u. 2, Abb. I) wurde mit dem Sternalmark einer 54jährigen Patientin, D.B. (Fall I), die wegen einer chronischen Polynephritis bei chronischem Tablettenabusus eingeliefert wurde, durchgeführt. Zur Zeit der Punktion zeigt das Blutbild eine geringe Anämie bei normaler Granulopoese. Mittels der Sternalpunktion wurde eine Eisenmangel-Anämie diagnostiziert.

Das Myelogramm des Originalausstriches zeigt eine Linksverschiebung der Erythropoese bei einer normalen Granulopoese mit einem G/E-Index von 2. Die Retikulumzellen sind im normalen Bereich. In der Granulopoese sind nur auffallend viele Promyelozyten mit 14,2%. Auffallend ist der weiße Mitoseindex von 2‰.

In dem Kontrollausstrich kommt es in der Granulopoese nach 24 Std. zu einer Vermehrung der teilungsfähigen Zellen, die durch 0,05 mg% 6-Mercaptopurinzusatz wieder signifikant verringert wird. Nach 48 Std., noch mehr nach 72 Std. treten wieder die reifen Zellen, insbesondere die segmentkernigen Granulozyten, stärker in Erscheinung. Durch 6-Mercaptopurin wird diese Tendenz noch verstärkt. Rechnerisch konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Der weiße Mitoseindex hat durch 6-Mercaptopurinzusatz ein wenig zugenommen,

ebenfalls hat nach 72 Std. auch der G/E-Index zugenommen, was indirekt durch eine leichte Abnahme des roten Mitoseindex bekräftigt wird. In der Erythropoese fällt besonders der starke Zuwachs der reifen Erythroblasten nach 48 Std. und nach 72 Std. auf, der durch 6-Mercaptopurinzusatz verstärkt wird.

Die zweite Versuchsreihe (Tab. 3 u. 4, Abb. 2) wurde mit dem Knochenmark einer 77jährigen Patientin, F.W. (Fall II), durchgeführt. Sie wurde mit einer chronischen Hepatitis bei Zustand nach einem Tonsillen-Karzinom eingeliefert. Das Blutbild ergab eine leichte Linksverschiebung der Leukozyten, eine Erythrozytenzahl von 2,75 Mill. pro cmm bei einem Hb_E von 35,2 pg. In dem Beckenkampunktat war die Granulopoese rechtsverschoben, die Erythropoese ein wenig vermindert und normoblastisch. Als sekundäre Tumorzeichen zeigten sich vermehrte Eosinophile, Megakaryozyten und Plasmazellen. Der Originalausstrich des Sternalpunktats zeigte eine normale Granulopoese und Erythropoese mit einem G/E-Index von 4,2.

In der Erythropoese finden wir einen erhöhten Mitoseindex von 72,2%. Besonders zahlreich sind im Originalausstrich die basophilen Erythroblasten mit 4,5%. In der Granulopoese fällt der besonders große Anteil der Promyelozyten mit 20,8% auf. Ansonsten zeigt sie eine normale Verteilung mit einem Mitoseindex von 21%.

Im 24-stündigen Kontrollausstrich fällt die Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten auf, obgleich die Granuloblasten gegenüber dem Originalausstrich immer noch ziemlich stark vertreten sind. Unter 6-Mercaptopurinzusatz sehen wir eine Verringerung der segmentkernigen Granulozyten, jedoch eine Vermehrung der Myelozyten, der weiße Mitoseindex hat sich von 28,2% gegenüber 32,8% der Kontrolle gering verkleinert. Nach 48 Std. und 72 Std. haben wir immer noch einen verkleinerten Mitoseindex, der jedoch nach 72 Std. gegenüber 48 Std. etwas zugenommen hat. Die Verteilung der einzelnen Zell-

typen ist beinahe identisch mit der der Kontrollversuche. Es fällt auf, daß sich der G/E-Index unter 6-Mercaptopurin nach 48 Std. und 72 Std. vergrößert hat. In der Erythropoese finden wir kaum signifikante Unterschiede, nur nach 24 Std. hat sich eine geringe Veränderung ergeben zu Gunsten der reifen Zellen.

Die dritte Untersuchungsreihe (Tab. 5, Abb. 3) wurde mit der Blutkultur einer 67jährigen Patientin, J. V. (Fall III), einer chronisch myeloischen Leukämie, durchgeführt. Das Sternalpunktat ergab eine sehr stark linksverschobene und vermehrte Granulopoese, wobei besonders zahlreich die Promyelozyten vertreten waren. Mitosen waren nicht vermehrt. Außerdem ergab sich eine verminderte Erythropoese.

Das Blutbild zeigte 217 000 Leukozyten, 3,22 Mill. Erythrozyten pro ml und einen verringerten Hb-Gehalt von 9,9 g%.

Das Hämatogramm des Originalausstrichs, das nach sechs Wochen stationärer Behandlung angefertigt wurde, ergab eine fast normale Differentialverteilung der Granulopoese. Der Mitoseindex war mit 8,2‰ so hoch wie im Knochenmark. Die Erythropoese konnte nicht ausgewertet werden, weil in der Blutkultur kaum Zellen der roten Reihe zu finden waren.

Der Kontrollausstrich zeigte nach 24 Std. eine geringe Abnahme der Promyelozyten, sowie einen noch stärkeren Anteil der segmentkernigen Granulozyten. Durch den 6-Mercaptopurinzusatz von 0,05 mg% wird diese Tendenz noch ein wenig verstärkt, gleichzeitig haben wir einen erhöhten Mitoseindex von 14‰ gegenüber 5,5‰ erhalten. Nach 48 Std. geht diese Entwicklung weiter, ohne eine nennenswerte Änderung. Die Unterschiede der Zusatzkulturen zu den Kontrollkulturen erwiesen sich als nicht signifikant.

Die vierte Untersuchungsreihe (Tab. 6 u. 7, Abb. 4) wurde anhand einer Blutkultur bei der 55jährigen Patientin G. L. (Fall IV) durchgeführt. Sie wurde mit der Diagnose Osteomyelosklerose, Leukose

und Hepatopathie eingewiesen. Das Beckenkampfpunktat sicherte dann die Diagnose eines Myeloblastenschubes bei bekannter Osteomyelosklerose. Zur Zeit der Punktion zeigte das Blutbild eine stark zurückgedrängte Erythropoese und eine Leukozytose von 67 000/cmm. Es waren fast nur Myeloblasten zu sehen. Das Hämatogramm des Originalausstriches erbrachte eine stark linksverschobene und vermehrte Granulopoese, so daß sich ein G/E-Index von 9,5 errechnen ließ. Die Granulopoese zeigte auffallend viele Blasten, wobei die Mikromyeloblasten - diese weitere Differenzierung war durch die vielen kleinen, unreifen lymphoiden Formen der Myeloblasten notwendig - mit 21,7% (Myeloblasten: 13,7%) dominieren. In der Erythropoese fanden sich keine Mitosen, in der Granulopoese ließ sich ein Mitoseindex von nur 6,9‰ errechnen. Nach 24 Std. kommt es in der Granulopoese zu einem leichten Anstieg der teilungsfähigen Granuloblasten, besonders der Myeloblasten und der Mikromyeloblasten, somit also zu einer verstärkten Linksverschiebung gegenüber dem Originalausstrich. Diese Tendenz wird durch den 6-Mercaptopurinzusatz von 0,05 mg% noch erheblich verstärkt. Dagegen hat sich der weiße Mitoseindex nach 24 Std. von 5,4‰ gegenüber der Kontrollkultur von 8,1‰ verkleinert. Der G/E-Index ist nach 24 Std. durch den Zusatz erhöht. Die abweichende Zellverteilung in der Erythropoese zeigte keine Signifikanz, wahrscheinlich durch eine zu geringe Zellzahl bedingt.

Die fünfte Versuchsreihe (Tab. 8 u. 9, Abb. 5) wurde mit der Sternalpunktion der 79jährigen Patientin E. K. (Fall V) durchgeführt. Sie wurde wegen einer akuten Leukoblastenleukämie und einer eitrigen Emphysebronchitis eingeliefert. Zur Zeit der Punktion zeigte das Blutbild eine Leukozytose von 65 000/cmm und eine hypochrome Anämie mit einem Hb von 6,28 g%. Die linksverschobene Granulopoese im Zusammenhang mit dem Blutbild spricht für eine chronische Myelose, die Myeloblastenvermehrung und der fehlende Milztumor mehr für eine akute Myeloblasten-Leukämie.

Acht Tage nach der Einlieferung bekam die Patientin eine Bronchopneumonie und kam im protrahierten Herz- und Kreislaufversagen zum Exitus letalis.

Der Originalausstrich des Sternalpunktats ergab eine Linksverschiebung der Granulopoese, vorwiegend Myeloblasten und Promyelozyten.

Ebenfalls war die Erythropoese leicht linksverschoben. Der G/E-Index betrug 2,4. In der Erythropoese war die Mitoseindex stark erhöht mit 70,9‰, in der Granulopoese nur gering mit 29‰.

Besonders zahlreich waren die Myeloblasten (19,2%) und die Promyelozyten (16,7%) in der stark linksverschobenen Granulopoese.

In dieser Versuchsserie, die diesmal mit 0,1 mg% 6-Mercaptopurin beschickt wurde, fällt in der Granulopoese nach 24 Std. die starke Rechtsverschiebung gegenüber des Kontrollausstriches auf. Der Mitoseindex ist von 8,9‰ auf 12,3‰ vermehrt, dagegen hat sich der G/E-Index von 6 zu 3,9 verändert. Nach 43 Std. wird die Tendenz bestätigt, mit Ausnahme des G/E-Index, der gegenüber der Kontrollserie wieder ansteigt, und nach 72 Std. kommt es zu einem größeren Anteil von segmentkernigen Granulozyten durch den 6-Mercaptopurinzusatz. Alle Veränderungen konnten auch rechnerisch als signifikant bestätigt werden.

In der Erythropoese haben wir nur nach 24 und 48 Std. signifikante Veränderungen. Nach 24 Std. kommt es zu einer leichten Rechtsverschiebung mit einem erniedrigten Mitoseindex.

Die sechste Untersuchungsreihe (Tab. 10 u. 11, Abb. 6) wurde mit dem Sternalmark des 35jährigen Patienten H. T. (Fall VI) durchgeführt. Bei ihm konnte später eine Lymphogranulomatose diagnostiziert werden.

Das Blutbild war unauffällig: Erythrozyten 3,46 Mill. pro ml, Hb_E 33,6% und Leukozyten 11000 pro ml. Das Blutbild zeigte eine Eosinophilie, die vom Punktat bestätigt wurde, ebenso sekundäre Tumorzellen, d.h. vermehrte Megakaryozyten und Plasmazellen.

In dem Myelogramm des Originalausstriches waren keine Veränderungen zu erkennen, auffällig war nur die Vermehrung der eosinophilen Myelocyten und die eosinophilen segmentkernigen Granulocyten. Es ließ sich ein normaler G/E-Index von 3,6 errechnen. Der rote Mitoseindex von 17‰ ist normal, dagegen der weiße mit 7‰ ein wenig erniedrigt. Auffallend ist der Anteil der polychromatischen Erythroblasten in der Erythropoese.

In der Granulopoese nehmen nach 24 Std. die teilungsfähigen Zellen leicht zu, ebenso der Mitoseindex von 12‰ gegenüber 7‰ des Originalausstriches. Durch den Zusatz von 0,1 mg% 6-Mercaptopurin wird die Linksverschiebung noch stärker, und der weiße Mitoseindex beträgt nur noch 2,9‰. Nach 48 und 72 Std. kommt es mehr zu einem Ausgleich, wobei die Zusatzkulturen wieder einen gering erhöhten Mitoseindex gegenüber den Kontrollkulturen zeigen; außerdem sind die teilungsfähigen Zellen immer noch vermehrt. Alle Veränderungen der drei Kulturzeiten sind signifikant.

In der Erythropoese kommt es nach 24 Std. zu einer starken Vermehrung der reiferen Erythroblasten, wobei zwischen den Kontroll- und den Zusatzkulturen lediglich nach 24 Std. signifikante Unterschiede bestehen. Der G/E-Index ist durch 6-Mercaptopurinzusatz ein wenig vermindert worden, allgemein ist er während der drei Kulturzeiten angestiegen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die einzelnen Versuchsreihen wurden nach der Konzentration, mit der die Kulturen angesetzt wurden, zusammengefaßt. Es wurden drei Konzentrationen von 0,05 mg%, 0,1 mg% und 0,5 mg% angesetzt. Die dritte Konzentration konnte nicht ausgewertet werden, da sich diese Ausstriche nicht differenzieren ließen. Das Zellmaterial war völlig zerstört. Somit kann die Aussage formuliert werden, daß ein Zusatz von 0,5 mg% 6-Mercaptopurin zu stark ist, um eine Proliferationshemmung der Granulopoese in einem therapeutischen Sinne zu erreichen.

Bei den ersten vier Versuchsreihen mit einem 6-Mercaptopurinzusatz von 0,05 mg% findet bei Fall I eine verstärkte Ausreifung (Abb. 1), besonders in der Granulopoese statt. Sie ließ sich in der Erythropoese bis zu 48 Std., in der Granulopoese bis zu 72 Std. durch die Signifikanzberechnung bestätigen. Fall II zeigt in der graphischen Darstellung keine deutliche Ausreifung in der Granulopoese. Es konnte aber eine signifikante Ausreifung für 24 Std. in der Erythropoese nachgewiesen werden. Fall III wurde ebenso wie Fall IV bei myeloischen Leukämien als Blutkulturen angesetzt und nur in der Granulopoese bis 48 Std. ausgewertet. In der Reifungskurve zeigte sich mit und ohne 6-Mercaptopurinzusatz eine leichte Rechtsverschiebung, die aber durch keine Signifikanz rechnerisch bestätigt werden konnte. Fall IV konnte nur bis 24 Std. ausgewertet werden. Hierbei wurden Myeloblasten und Mikromyeloblasten differenziert. Die graphische Darstellung (Abb. 4) zeigt durch den Zusatz eine signifikant noch geringere Ausreifung in der Granulopoese als ohne denselben. Wir haben bei dieser Leukämie durch 6-Mercaptopurin eine starke Linksverschiebung im Gegensatz zu der im Fall III ausreifenden.

Fall V und Fall VI wurden mit der doppelten Konzentration von

0,1 mg% angesetzt. Bei Fall V (Abb. 5) zeigt sich in der Granulopoese eine deutliche Ausreifung, die nach 24 Std., 48 Std. und 72 Std. durch die Signifikanzberechnung bestätigt werden konnte. Die Erythropoese (Abb. 5) zeigt andererseits eine Zunahme der basophilen und polychromatischen Erythroblasten nach 48 Std. In diesem Fall wurde nur nach 24 Std. eine beschleunigte Ausreifung erzielt. Fall VI zeigt auf der graphischen Darstellung (Abb. 6) kaum Unterschiede, aber eine signifikante Ausreifungshemmung in der Granulopoese.

Die karyologischen Kurven (Abb. 7 u. 8) der Erythropoese, der Granulopoese sowie der einzelnen Reifestadien der Erythropoese und der Granulopoese zeigen keine auffälligen Unterschiede und bestätigen damit die bisher in der Literatur vertretene Meinung, daß 6-Mercaptopurin kein Mitosegift im engeren Sinne ist. Nach Tabelle 12 werden auch keine Reifungsstufen bevorzugt in Mitose gesehen. Auch ein Vergleich der Mittelwerte der Mitoseindices (Tab. 13 u. 14) ergibt keine Differenz. Die Abweichungen der Mitoseindices nach 6-Mercaptopurinzugabe von den gefundenen Werten in den Kontrollen sind in keinem Fall signifikant, sondern müssen als zufallsbedingt betrachtet werden. Ebenfalls wurden die Mitoseindices der einzelnen Reifestadien errechnet, die aber auch keine nennenswerten Unterschiede zeigten. Als weiteren Versuch, eine Aussage zu erhalten, dient Abbildung 9, auf der die Myeloblasten-, Promyelozyten- und Myelozytenmitosen auf der Abzisse aufgetragen wurden. Dabei zeigen Kontrolle und Zusatz beinahe übereinstimmende Ergebnisse.

IV. DISKUSSION

In der Literatur werden viele klinische Fälle beschrieben, die von Remissionen akuter Leukämien nach 6-Mercaptopurinbehandlung berichten, jedoch sind nur wenige Arbeiten über die direkte Wirkung von 6-Mercaptopurin auf das menschliche Knochenmark bekannt.

Am nicht leukämischen Knochenmark soll geklärt werden, inwieweit 6-Mercaptopurin bei der zytostatischen Behandlung bösartiger Tumoren auf normales Wechselgewebe toxisch wirkt (15). Da die Knochenmarkszellen die höchste Proliferationsaktivität zeigen, könnten bei ihnen auch funktionelle Veränderungen morphologisch schnell erkannt werden. Wir sprechen erst dann von einer Proliferationshemmung, wenn eine verminderte Zahl teilungsfähiger Granuloblasten bzw. eine fehlende Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten unter Kulturbedingungen vorliegt. Die Mitoseindices geben uns im Zusammenhang mit den karyologischen Kurven darüber Aufschluß, ob die Regeneration vermehrt oder vermindert ist, die Reifungskurven, ob es zu einer beschleunigten Ausreifung gekommen ist oder nicht.

Die Betrachtung der karyologischen Kurven (Abb. 7 u. 8) zeigen, daß die Verteilung der einzelnen Mitosephasen beinahe identisch ist mit der der Kontrollkulturen, also hier sich die Aussage formulieren läßt, daß 6-Mercaptopurin die Mitosen in keiner bestimmten Mitosephase hemmt. Die kurzfristige Verringerung des Mitoseindex unter 0,05 mg% 6-Mercaptopurinzusatz, die etwas längere unter 0,1 mg% 6-Mercaptopurinzusatz deutet damit auf eine Herabsetzung der Mitoserate durch Verlängerung der Interphase hin (4, 18).

DUSTIN erklärt den Wirkungsmechanismus folgendermaßen: nach der interkinetischen Ruhephase ist die Zeit der Chromosomenverdoppelung, also der erhöhten DNS-Synthese der Angriffspunkt der Zytostatika.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die Proliferation im leukämischen Knochenmark und Blut durch 6-Mercaptopurin verändert werden kann. Bei Fall III bis V liegt leukämisches Knochenmark, dagegen bei Fall I, II und VI relativ normales Knochenmark vor. Wir müssen beachten, daß es bei Knochenmarkkulturen keine Zu- und Abwanderungsmöglichkeiten zu der vorhandenen Zellpopulation gibt, also weder ein Nachschub von Stammzellen noch eine Ausscheidung der reifen Granulozyten möglich ist. Außerdem wird durch den in-vitro-Versuch jeder Einfluß von anderen Organen, sei er humoral oder nerval, ausgeschaltet. In unseren Versuchsreihen müssen wir weiter die verschiedenen Konzentrationen (Fall I-IV 0,05 mg% und Fall V u. VI 0,1 mg% 6-Mercaptopurinzusatz) neben der Qualität des Knochenmarks, insbesondere leukämisches, berücksichtigen.

Bei der Betrachtung der 24-stündigen Kontrollkulturen finden wir im normalen Knochenmark eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten, was nach BOLL auf die Mitose- und wachstumsfördernde Wirkung des Corticohormons in der Koagulumkultur und die kurze Lebensdauer der segmentkernigen Granulozyten zurückzuführen ist. Nach 48 und 72 Std. kommt es in allen Kontrollversuchen des nicht leukämischen (Abb. 1, 2 u. 6) Knochenmarkes zu einer stärkeren Ausreifung der Granulopoese (1, 6).

Im nicht leukämischen Knochenmark zeigt 0,05 mg% 6-Mercaptopurin keine einheitliche Wirkung auf die Proliferation der Granuloblasten (Tab. 14, Abb. 1 u. 2), 0,1 mg% hemmt die Regeneration und Reifung nach 24 Std.; später wird die Proliferationshemmung ausgeglichen (Fall VI).

Bei der Betrachtung der Kontrollen von Knochenmark bei akuten Leukämien läßt sich die Meinung nicht mehr aufrechterhalten, daß die Proliferation vermehrt ist. Die Regenerationsaktivität

ist vermindert (BOLL). Die Reifung ist bei der verlängerten Lebensdauer der Granuloblasten gestört, kommt allerdings in zwei von drei untersuchten Fällen in vitro in Gang. Leukämische Blutkulturen zeigen durch 0,05 mg% 6-Mercaptopurinzusatz bei einer von zwei Fällen eine Vermehrung der Regeneration ohne Reifungsbeschleunigung, im anderen Fall eine Proliferationshemmung. Im leukämischen Knochenmark (Fall V) wurde durch den Zusatz von 0,1 mg% 6-Mercaptopurin nach 24 Std. die Reifung beschleunigt oder Myeloblasten vermehrt zerstört, jedoch läßt die Wirkung des Pharmakons während der nächsten zwei folgenden Kulturtage in seiner Wirkung erheblich nach.

Bei beiden Konzentrationen finden wir nach 72 Std. eine der Kontrolle sehr ähnliche Mitoseaktivität, ebenso kann dann von einer Reifungsförderung nicht mehr die Rede sein. Betrachten wir unsere Befunde bezüglich der Erythropoese, so findet sich nur in Fall I und Fall V ein signifikanter Unterschied. Bei allen anderen Fällen war die Auswertung entweder nicht möglich oder es ist in den Reifungskurven kaum eine Veränderung vorhanden. In beiden Fällen kommt es in den Kontrollkulturen während der Bebrütungszeiten zu einer Ausreifung, die durch die Zugabe von 6-Mercaptopurin noch verstärkt wird. Diese Rechtsverschiebung wird durch eine verminderte Regeneration begleitet, die sich in dem herabgesetzten Mitoseindex äußert.

In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, in der die Wirkung des 6-Mercaptopurins auf Gewebekulturen vom Knochenmark akuter Leukosen untersucht wurde. GERHARTZ gibt an, daß 6-Mercaptopurin zu einer Zunahme der Prophasen und der frühen Metaphasen unter Verringerung aller späteren führt; außerdem, daß der prozentuale Gehalt an Myeloblastenmitosen erheblich gesteigert wird. Damit soll 6-Mercaptopurin den

Ablauf der Myeloblastenmitosen verzögern und eine Ausreifungshemmung bewirken. Diese Auffassung von der Wirkung des 6-Mercaptopurins auf das menschliche Knochenmark kann unsere Arbeit nicht bestätigen, da sich in allen sechs Fällen, also bei normalem sowie bei leukämischem Knochenmark bei unterschiedlicher Konzentration, weder eine Vermehrung der Myeloblastenmitosen (Abb. 9) noch eine allgemeine der Prophasen und der frühen Metaphasen (Abb. 7) zeigte. In den karyologischen Kurven sah man geradezu eine Übereinstimmung, die jede weitere Diskussion in dieser Richtung erübrigt. GERHARTZ irrt also, wenn er glaubt, daß 6-Mercaptopurin ein Mitosegift ist und es speziell auf einen Zelltyp wirkt.

Diese Arbeit bestätigt die tierexperimentellen und klinischen Erfahrungen, daß 6-Mercaptopurin kein Mitosegift im engeren Sinne ist, auch nicht spezifisch auf einen Zelltyp wirkt. Weiterhin läßt sich aus den Versuchen (Abb. 1 bis 6) sagen, daß eine Unabhängigkeit der Parameter der Regeneration und der Reifung besteht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchen die Wirkung von 6-Mercaptopurin an Knochenmark-Koagulumkulturen von drei leukämischen und drei nicht leukämischen Patienten. Wir stellen die Beeinflussung der Zellproliferation durch das Zytostatikum mittels Reifungskurven und Mitoseindices bis zu drei Kulturtagen dar.

Die Konzentration von 0,5 mg% 6-Mercaptopurin ergibt so viele zerstörte Zellen, daß sie nicht ausgewertet werden können.

In der Konzentration von 0,05 mg% zeigt 6-Mercaptopurin keine deutliche Beeinflussung der Regeneration und eine Reifungshemmung der Erythropoese. Durch die höhere Konzentration von 0,1 mg% 6-Mercaptopurin bekommen wir eine Reifungshemmung in der Granulopoese, wobei sich die Ergebnisse des leukämischen Knochenmarks deutlich von denen des nicht leukämischen abhebt. Die Blutkulturen eignen sich weniger zur Testung des Zytostatikums, da die Wirkung des 6-Mercaptopurins nicht deutlich ist.

VI. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall I: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 24 h:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	13	4	8	5	3,2
PM	469	586	528	59	4,7
MC	332	330	181	151	125,4
eMC	117	89	103	14	1,9
PMo	39	15	27	12	5,3
MM	177	103	140	37	8,9
StG	50	90	70	20	5,7
SG	319	398	358	39	4,5
eSG	25	19	23	3	0,7
Mo	10	17	13	3	0,4
$\chi^2 =$					160,2

0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 48 h:

MB	4	0	2	2	2,0
PM	249	490	370	121	38,8
MC	419	410	415	4	0,0
eMC	94	95	95	1	0,0
PMo	29	14	22	7	2,2
MM	189	168	178	11	0,7
StG	148	107	127	21	3,5
SG	513	440	476	35	2,6
eSG	26	29	28	2	0,1
Mo	10	10	10	0	0,0
$\chi^2 =$					49,9

0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 72 h:

MB	0	0	0	0	0,0
PM	45	149	85	40	18,8
MC	218	291	224	6	0,2
eMC	48	69	51	3	0,2
PMo	17	17	15	2	0,3
MM	171	202	164	7	0,3
StG	143	103	108	35	11,3
SG	373	455	364	9	0,2
eSG	24	23	21	3	0,4
Mo	19	11	13	6	2,7
$\chi^2 =$					34,4

Tabelle 2: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall I: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 24 h:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	85	55	70	15	3,2
bE	123	259	191	68	24,2
pE	341	420	380	39	4,0
oE	95	122	109	14	1,8
rE	370	174	272	98	35,2
$\chi^2 =$					68,4

0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 48 h:

PE	46	27	34	12	0,1
bE	36	106	67	31	14,0
pE	201	205	191	10	0,5
oE	54	108	76	22	6,4
rE	350	328	319	31	3,0
$\chi^2 =$					28,1

0,05 mg% 6-Mercaptopurin nach 72 h:

PE	12	8	11	1	0,1
bE	68	31	55	13	3,0
pE	79	114	108	29	7,8
oE	85	63	83	2	0,0
rE	222	140	205	17	1,4
$\chi^2 =$					12,3

Die Tabellen 3 - 11 werden verkürzt wiedergegeben.

Hierbei sind jeweils die Summe der Einzelergebnisse (Δ^2/m) bei den entsprechenden Kulturzeiten angegeben.

Tabelle 3: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall II: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin

Zelltyp	24 h	48 h	72 h
MB	0,0	0,0	0,0
PM	3,7	0,8	0,0
MC	2,2	2,1	0,0
eMC	4,9	0,8	1,2
PMo	1,9	5,4	0,5
MM	4,8	0,1	0,3
StG	0,5	2,1	0,1
SG	28,9	15,3	0,0
eSG	2,9	10,5	6,6
Mo	<u>0,0</u>	<u>0,1</u>	<u>2,0</u>
χ^2	49,8	37,2	10,7

Tabelle 4: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall II: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin

Zelltyp	24 h	48 h	72 h
PE	6,0	1,0	0,0
bE	5,8	3,1	0,3
pE	1,2	0,8	0,1
oE	1,3	0,0	5,6
rE	<u>1,6</u>	<u>1,5</u>	<u>2,8</u>
χ^2	15,9	6,4	8,8

Tabelle 5: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall III: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin

Zelltyp	24 h	48 h	72 h
MB	9,8	0,1	
PM	1,0	1,4	
MC	3,3	0,2	
eMC	0,2	0,0	
PMo	0,0	1,0	
MM	0,0	4,8	
StG	1,5	0,0	
SG	0,0	1,7	
eSG	2,8	3,0	
Mo	<u>1,0</u>	<u>1,6</u>	
χ^2	19,6	13,8	

Tabelle 6: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall IV: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin

<u>Zelltyp</u>	<u>24 h</u>
MB	22,4
MBmikro ⁺⁾	0,8
PM	21,5
MC	5,6
eMC	0,0
PMo	0,5
MM	7,4
StG	1,0
SG	9,8
eSG	0,0
Mo	<u>0,7</u>
χ^2	= 69,7

Tabelle 7: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall IV: 0,05 mg% 6-Mercaptopurin

<u>Zelltyp</u>	<u>24 h</u>
PE	1,1
bE	0,1
pE	2,3
oE	5,1
rE	<u>2,9</u>
χ^2	= 11,5

⁺⁾ Mikromyeloblasten

Tabelle 8: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall V: 0,1 mg% 6-Mercaptopurin

<u>Zelltyp</u>	<u>24 h</u>	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>
MB	78,1	8,0	1,8
PM	2,1	0,8	5,7
MC	3,4	10,2	17,2
eMC	0,3	0,3	0,0
PMo	1,1	0,1	0,0
MM	0,0	0,6	3,7
StG	1,2	3,7	0,0
SG	3,2	6,4	0,3
eSG	1,0	0,7	1,8
Mo	<u>0,0</u>	<u>2,8</u>	<u>1,3</u>
χ^2	90,4	33,6	36,8

Tabelle 9: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall V: 0,1 mg% 6-Mercaptopurin

<u>Zelltyp</u>	<u>24 h</u>	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>
PE	0,5	0,0	0,0
bE	0,1	3,8	2,3
pE	3,7	46,3	4,0
oE	3,3	0,1	0,6
rE	<u>9,9</u>	<u>1,7</u>	<u>1,8</u>
χ^2	17,5	51,8	8,9

Tabelle 10: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall VI: 0,1 mg% 6-Mercaptopurin

Zelltyp	24 h	48 h	72 h
MB	0,3	1,0	1,0
PM	2,7	0,8	11,5
MC	1,3	0,3	0,0
eMC	11,1	0,1	1,3
PMo	0,1	4,9	0,0
MM	0,0	0,0	2,9
StG	3,2	0,1	0,0
SG	9,6	0,4	3,1
eSG	1,1	18,2	7,1
Mo	<u>6,1</u>	<u>0,2</u>	<u>0,6</u>
χ^2	35,5	26,0	27,5

Tabelle 11: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall VI: 0,1 mg% 6-Mercaptopurin

Zelltyp	24 h	48 h	72 h
PE	0,1	0,4	1,0
bE	8,4	5,1	0,3
pE	1,7	4,5	0,3
oE	7,8	21,1	0,1
rE	<u>0,4</u>	<u>0,0</u>	<u>0,1</u>
χ^2	18,4	31,1	1,8

Tabelle 12: Mitoseindices der einzelnen Reifestadien, wobei die drei verschiedenen Kulturzeiten zusammengefaßt wurden.

Erythropoese

<u>Zelltyp</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>Zusatz</u>
PE	11,7‰	8,1‰
bE	52,6‰	44,1‰
pE	67,2‰	36,4‰
oE	0,0‰	0,0‰

Granulopoese

MB	4,1‰	3,4‰
PM	8,4‰	9,5‰
MC	15,7‰	14,5‰
eMC	27,3‰	15,5‰
PMo	0,0‰	0,0‰

Tabelle 13: Mitose-Indices der Erythropoese (in Promille)

	Original	Kontrolle			6-Mercaptopurin 0,05 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I:	22,0	37,0	53,0	69,0	10,8	35,6	53,0
Fall II:	72,2	49,3	65,4	39,3	40,8	58,8	51,0
Arith. Mittel	47,1	43,2	59,2	54,2	25,8	47,2	52,0
	Original	Kontrolle			6-Mercaptopurin 0,1 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall V:	71,0	53,0	30,0	70,0	42,1	15,4	50,0
Fall VI:	17,0	5,0	32,0	-	9,3	9,6	-
Arith. Mittel	44,0	29,0	31,6	70,0	25,7	12,5	50,0

Tabelle 14: Mitose-Indices der Granulopoese (in Promille)

	Original	Kontrolle			6-Mercaptopurin 0,05 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I:	2,0	15,0	10,9	22,5	20,5	11,3	33,5
Fall II:	21,0	32,8	24,6	17,0	28,2	11,7	15,2
Fall III:	8,2	5,5	-	-	14,0	4,1	-
Fall IV:	6,9	8,1	-	-	5,4	-	-
Arith. Mittel	9,5	15,4	17,7	19,7	17,2	9,1	24,4
	Original	Kontrolle			6-Mercaptopurin 0,1 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall V:	29,0	8,9	22,0	20,0	12,3	7,4	7,7
Fall VI:	7,0	12,0	3,2	7,4	2,9	8,6	8,8
Arith. Mittel	18,0	10,5	12,6	13,7	7,7	8,0	8,3

Tabelle 15: G/E - Indices

	Original 0h	Kontr. /6-MP 24 h		Kontr. /6-MP 48 h		Kontr. /6-MP 72 h	
	0	0	0,05 mg%	0	0,05 mg%	0	0,05 mg%
Fall I:	2,0	1,55	1,53	2,27	2,40	3,9	2,27
Fall II:	4,2	3,3	2,3	2,9	4,0	2,0	6,3
	0	0	0,1 mg%	0	0,1 mg%	0	0,1 mg%
Fall V:	2,4	6,0	3,9	2,5	3,5	2,5	7,3
Fall VI:	3,6	2,8	2,1	2,9	2,4	5,0	3,2

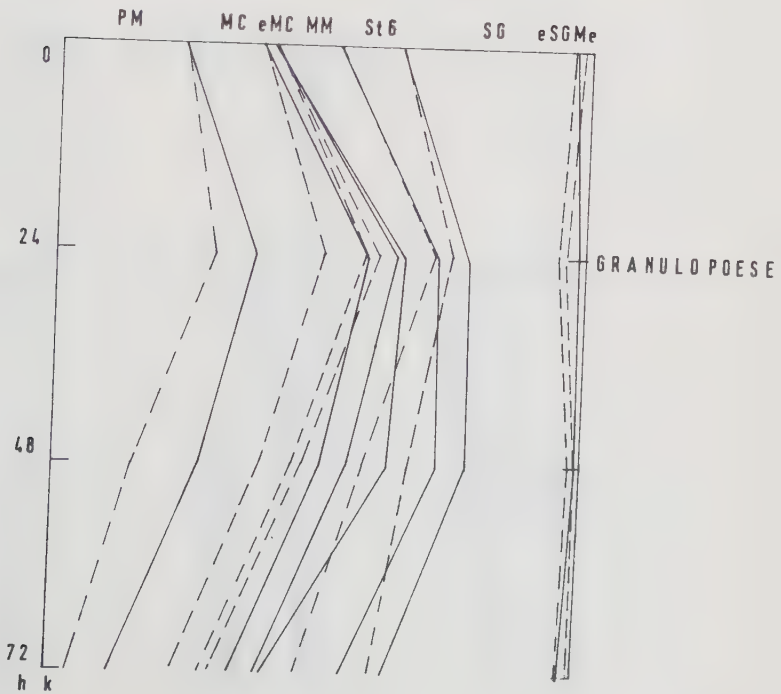
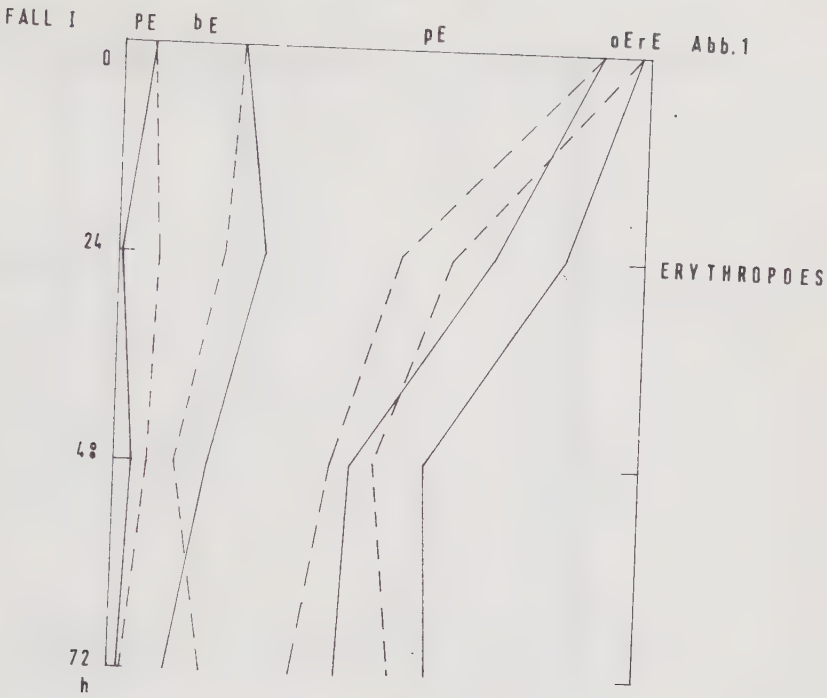
Zeichenerklärung zur Darstellung der Reifungskurven:

Oben ist die Differentialverteilung der Erythro- bzw. Granulopoese in Prozent (die Nomenklatur wird auf Seite 10 u. 11 ausführlich besprochen), senkrecht dagegen die Kulturzeit in Stunden aufgetragen. In sämtlichen Kurven bedeuten (Abb. 1 bis 9):

———— = Darstellung der Kontrollen

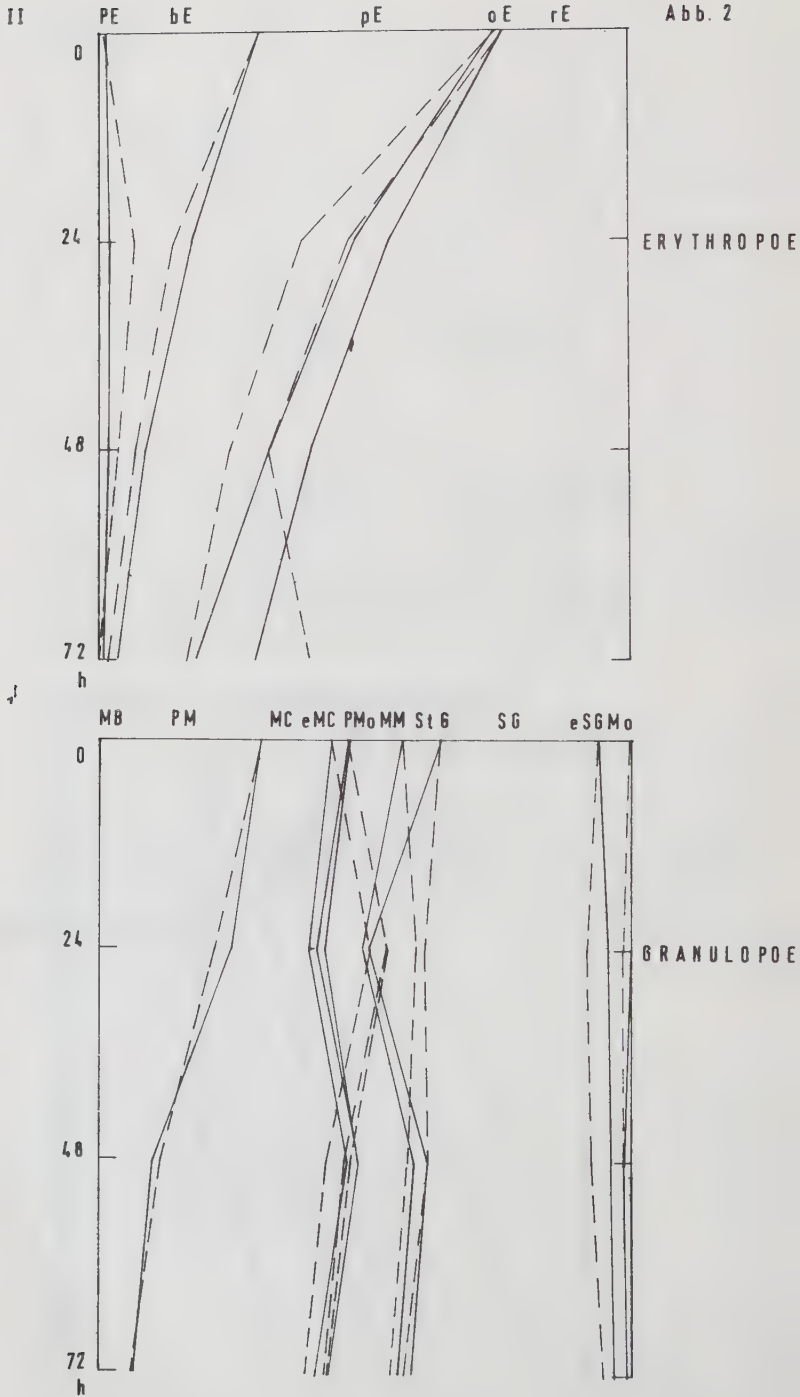
----- = Darstellung der 6-Mercaptopurinzusätze

In den karyologischen Kurven der Mitosephasenverteilung sind waagerecht die verschiedenen Mitosephasen, senkrecht ihr prozentualer Anteil dargestellt (die Nomenklatur wird auf Seite 13 u. 14 besprochen).

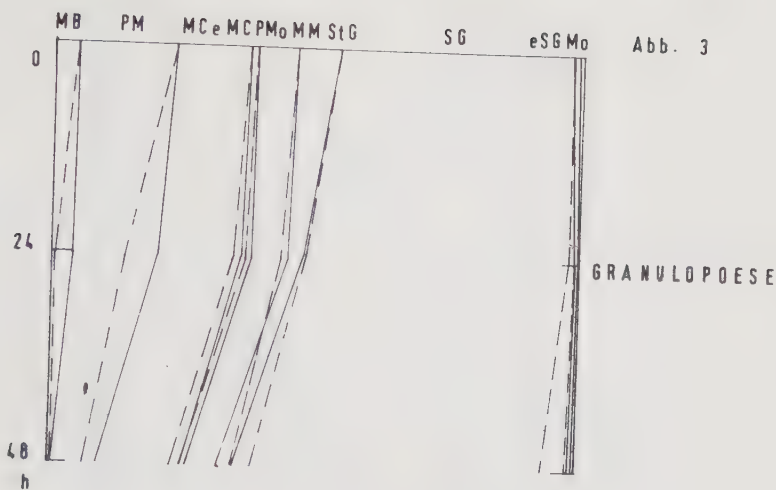


FALL II

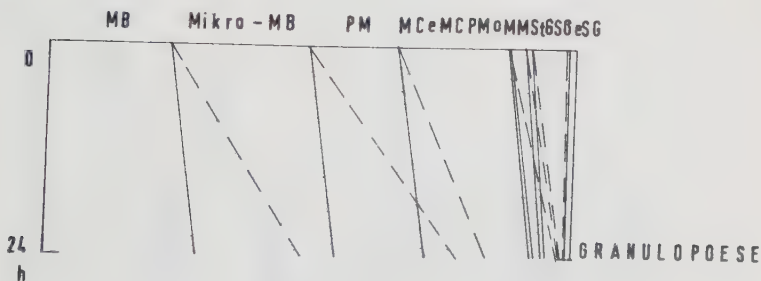
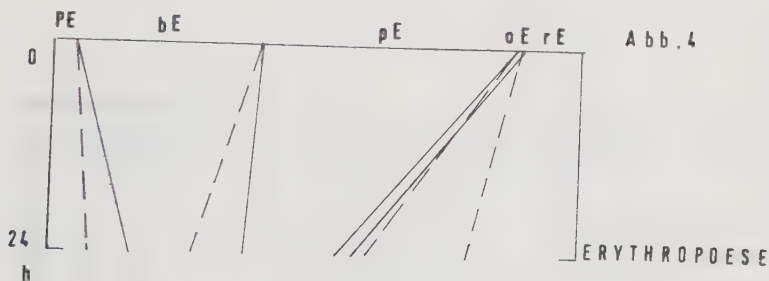
Abb. 2



FALL III



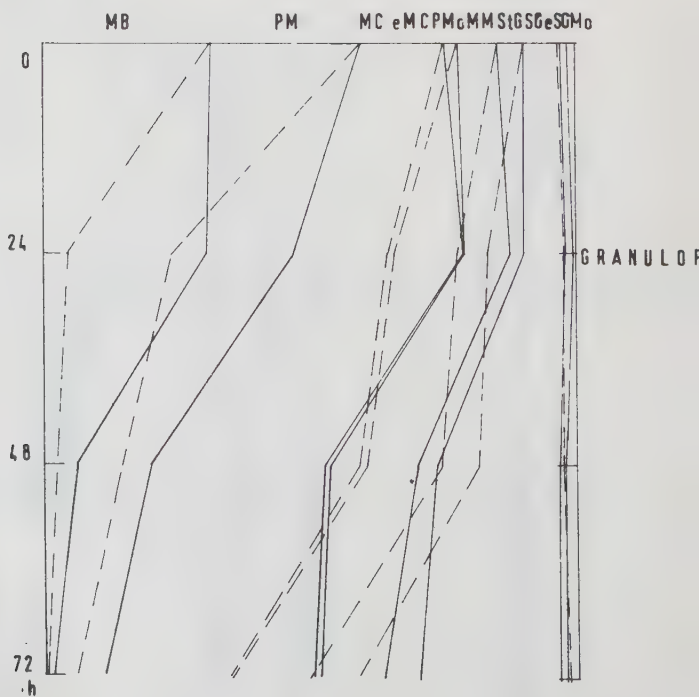
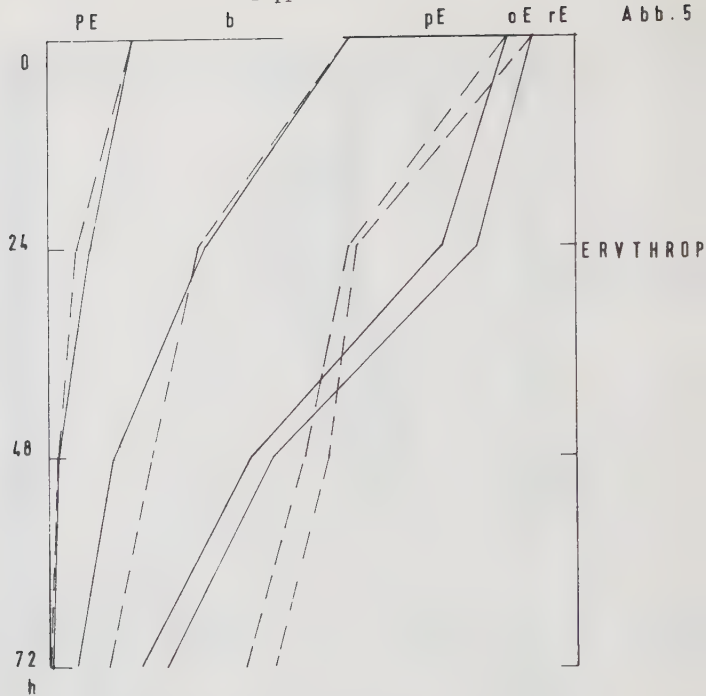
FALL IV



FALL V

- 41 -

Abb. 5



FALL VI

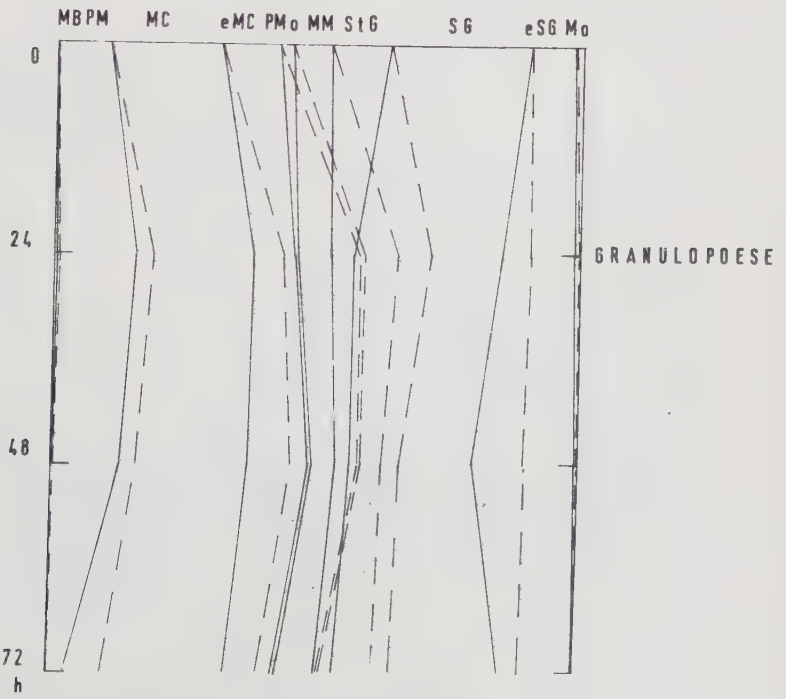
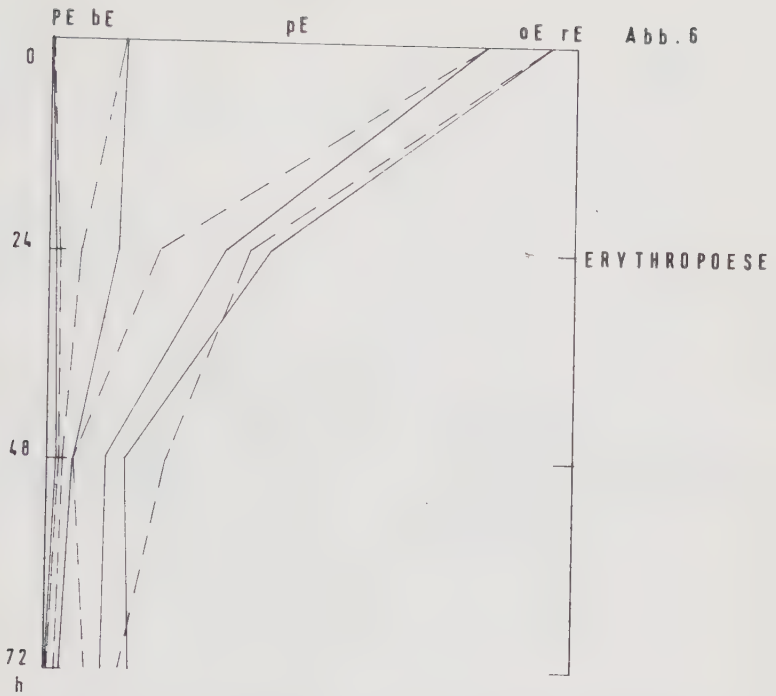
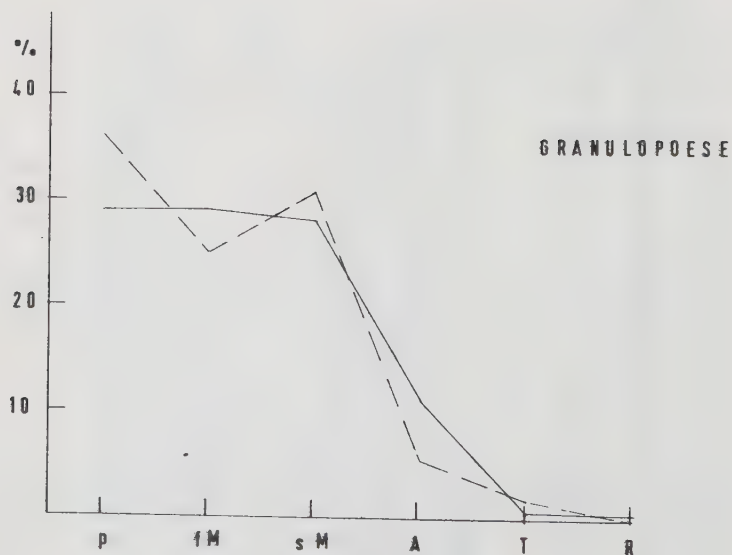
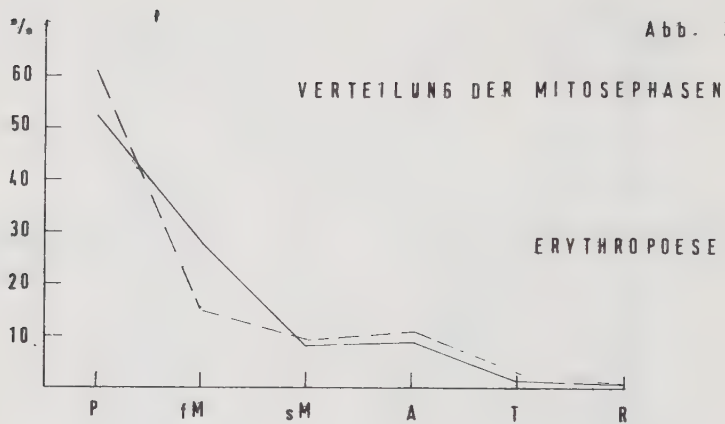
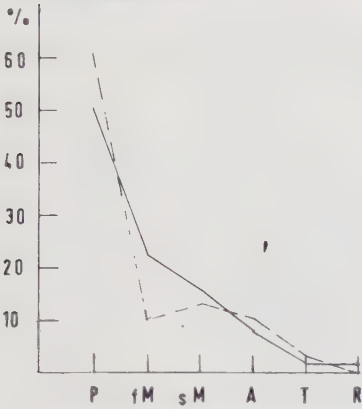


Abb. 7

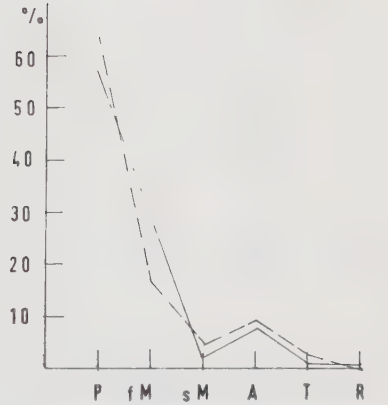


ERYTHROPOESE



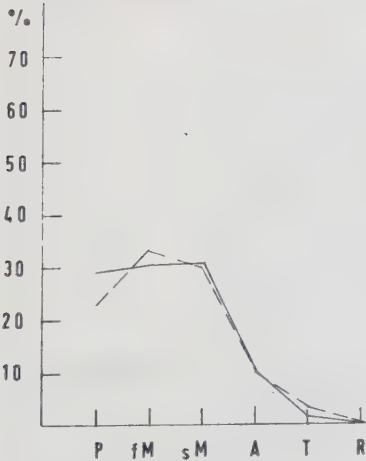
1. PROERYTHROBLASTEN UND
BASOPHILE ERYTHROBLASTEN

Abb. 6

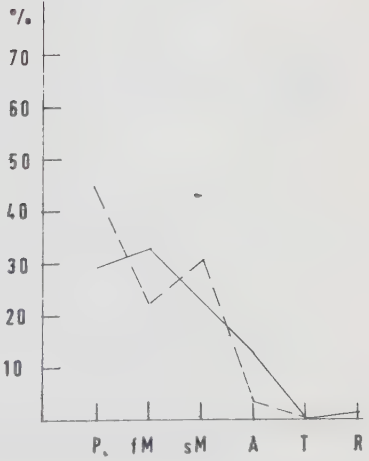


2. POLYCHROMATISCHE ERYTHRO-
BLASTEN UND OXYPHILE ERY-
THROBLASTEN

GRAMULOPOESE



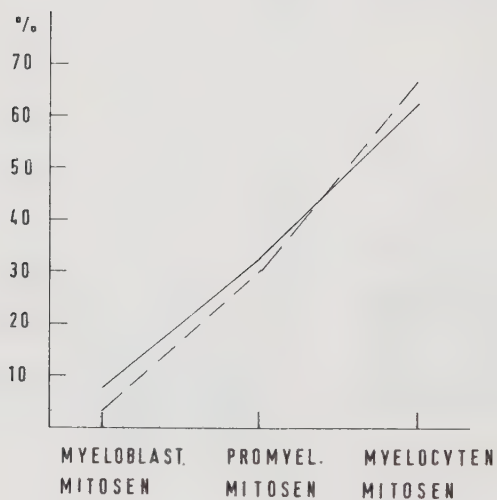
3. MYELOBLASTEN
PROMYELOBLASTEN



4. MYELOCYTEN

ANTEIL DER ZELLTYPEN AN DEN MITOSEN

Abb. 9



VII. LITERATUR

1. BETHEL, F.H. u. THOMPSON, D.S.: Treatment of leukaemia and related disorders with 6-mercaptopurine.
Ann. N.Y. Acad.Sc., 60, art. 2, 436 (1954).
2. BODLEY SCOTT, R.: The treatment of acute leukaemia.
Brit.Med.J., ii, 75 (1955).
3. BOLL, I.: Granulopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Heidelberg 1966.
4. BOLL, I. u. G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII, 257 (1961).
5. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro. I. Granuloblastenmitosen.
Folia haemat. 3, 58 (1958).
6. BOLL, I. u. ALBRECHT, M.: Die Einwirkung von Aminopterin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Z.Krebsforsch. 57, 496 (1951).
7. BOLL, I. u. SCHLAG, H.: Untersuchungen über die Einwirkung von Teropterin u. Aminopterin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Z.Krebsforsch. 57, 643 (1951).
8. BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulozytopoese.
Fol haemat. (Leipzig) 91, 172 (1969).
9. BROSS, I.D.J.: Statistical analysis of clinical results from 6-mercaptopurine.
Ann. N.Y.Acad. Sc., 60, art. 2, 369 (1954).

10. BURCHENAL, J.H., KARNOFSKY, D.A., MURPHY, M.L.,
ELLISON, R.R. u. RHOADS, C.P.:
Effects of 6-mercaptopurine in man.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res., 1, 7 (1953).
11. BURCHENAL, J.H., MURPHY, M.L., ELLISON, R.R.,
SYKES, M.P., TAN, T.C., LEONE, L.A.,
KARNOFSKY, D.A., CARVER, L.F., DARGEON, H.W.
u. RHOADS, C.P.: Clinical evaluation of a new
anti-metabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment
of leukemia and allied diseases.
Blood, 8, 965 (1953).
12. BURCHENAL, J.H., ELLISON, R.R., MURPHY, M.L.,
KARNOFSKY, D.A., SYKES, M.P., TAN, T.C.,
MERMANN, A.C., YUCEOGLU, M., MYERS, W.P.L.,
KRAKOFF, I. u. ALBERSTADT, N.: Clinical studies
on 6-mercaptopurine.
Ann. N.Y.Acad.Sc., 60, art. 2, 359 (1954).
13. BURCHENAL, J.H., MURPHY, M.L. u. TAN, T.C.:
Treatment of acute leukaemia.
Pediatrics, 18, 643 (1956).
14. BURCHENAL, J.H., KARNOFSKY, D.A., MURPHY, M.L.,
ELLISON, R.R., SYKES, M.P., TAN, T.C.,
MERMANN, A.C., YUCEOGLU, M. u. RHOADS, C.P.:
Clinical evaluation of 6-mercaptopurine in the
treatment of leukaemia.
Amer.J.Med.Sc., 228, 371 (1954).
15. CLARK, P.A. u. Mitarb.: Toxic complications of treatment
with 6-mercaptopurine.
Brit.Med.J., i, 393 (1960).
16. DAMESHEK, W.: The use of 6-mercaptopurine in acute leukemia.
Ann. N.Y.Acad.Sc., 60, art. 2, 447 (1954).

17. DAVIDSON, J.D. and T.S. WINTER: Purine nucleotide pyrophosphorylase in 6-mercaptopurine-sensitive and -resistant human leukemias.
Cancer Res. 24, 261 (1964), Ref.Kgr.Z. 269, 3:294 (1965).
18. DUSTIN, P.: Die zytostatischen Substanzen und ihre Wirkung auf die Hämatopoese.
Handbuch der ges. Hämatologie, III. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1960).
19. ELION, G.B., SINGER, S. u. HITCHINGS, G.H.:
Microbiological effects of 6-mercaptopurine.
Ann. N.Y.Acad.Sc., 60, art. 2, 200 (1954).
20. ELION, G.B., BIEBER, S. u. HITCHINGS, G.H.: The fate of 6-mercaptopurine in mice.
Ann. N.Y.Acad.Sc., 60, art. 2, 297 (1954).
21. ELION, G.B. u. HITCHINGS, G.H.: Biochemical effects of 6-mercaptopurine.
Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, S. 268 (1957).
22. FINGER, H.: Die Depression der primären Immunitätsreaktion durch 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid bei verschiedenen Tierarten.
Z. ges. exp. Med. 143:105 (1967).
23. FINGER, H.: Die unterschiedliche Beeinflussung der Antikörperbildung von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen durch 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid.
Ref.Kongr.Z. 296, 2:180 (1968).
24. FOUNTAIN, J.R.: Treatment of leukaemia and allied disorders with 6-mercaptopurine.
Brit.Med.J., i, 1119 (1955).

25. FOUNTAIN, J.R.: Treatment of chronic myeloid leukaemia with mercaptopurine.
Brit.Med.J., ii, 1345 (1956).
26. Geigy documenta. Wissenschaftliche Tabellen.
J.R. Geigy, Basel 1960.
27. GERHARTZ, H., H. KESSEL u. W. WEISE: Die klinische Bedeutung der Zytostatika zur Unterdrückung von Autoimmunreaktionen.
Dtsch.Ges.inn.Med. 72, 320 (1966).
28. GERHARTZ, H. u. W. WEISE: Die Chemotherapie der Autoaggressionskrankheiten.
Intern. Zeitschr. für klin. Pharmak. Therapie u. Toxikologie 1 (1967).
29. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958).
30. GUNZ, R.W. und BURNS, E.W.: Prognosis in Acute Leukaemia od Adults.
N. Zealand Med.J., 64, 555 (1966).
31. HAMILTON, L. und ELION, G.B.: The fate of 6-Mercaptopurine in man.
Ann. N.Y. Acad.Sc., 60, art. 2, 304 (1954).
32. HAYHOE, F.G.J.: 6-Mercaptopurine in acute leukaemia.
Lancet, ii, 903 (1955).
33. HITCHINGS, G.H. und ELION, G.B.: The chemistry and biochemistry of purine analogs.
Ann.N.Y. Acad.Sci., 60, art. 2, 195 (1954).
34. MOESCHLIN, S.: Fortschritte der Haematologie.
Schweiz.med.Wschr., 90, 1117 (1960).
35. OEHME, J.: Besonderheiten der Leukämiebehandlung im Kindesalter
Wien.klin.Wschr., 73, 134 (1961)

36. OEHME, J.: Die Therapie der Leukämien im Kindesalter.
Blut, 9, 471 (1963).
37. PRIBILLA, W.: Die Therapie der Leukämien.
Zur Fortbildung - Aktuelle Medizin.
DÄ Nr. 1/ 6.1.68, 11.
38. SALSER, J.S. und BALIS, M.E.: The Mechanism of Action
of 6-Mercaptopurine.
Cancer Res., 25, 539 (1965).
39. SKOPINSKA, E., M. RYCHLIKOWA and K. NOUZA:
Immunosuppressive drugs in lymphocyte mixed
cultures.
Bull. Acad. Pol. Sci. 16, 6:385 (1968).
Ref. Exc. Med. 3.4 Nr. 927 (1969).
40. WITTS, L.J.: Treatment of Acute Leukaemia in Adults.
Comparison of Steroid Therapy at High and Low
Dosage in Conjunction with 6-Mercaptopurine.
Brit. Med. J., i, 7 (1963).
41. ZUELZER, W.W.: Implications of Long-Term Survival in
Acute Stem Cell Leukemia in Childhood Treated
with Composite Cyclic Therapy.
Blood, 24, 477 (1964).

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSF,
Nr. 031-64-1 BIAD.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Professor Dr. I. BOLL
für die Überlassung des Themas und für ihre Anregungen
bei der Ausführung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 5.6.1944 in Berlin geboren. Besuch der 6. Grundschule in Berlin-Charlottenburg, der St. Marienschule und der Ernst-Abbe-Schule in Berlin-Neukölln.

Reifeprüfung im Februar 1965. Im Sommer 1965 Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Freien Universität Berlin. Zahnärztliche Vorprüfung im Sommer 1967 und zahnärztliche Prüfung im Sommer 1970.

